

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



**Nikola Málková**

Derivatizace obtížně ionizovatelných nenabitých komplexů rhenia pro možnost identifikace pomocí ESI-HRMS

Chemical treatment of weakly ionizable uncharged complexes of rhenium for the possible identification by ESI-HRMS

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Martin Štícha, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.

Praha 2018

## **Prohlášení o autorství**

Prohlašuji, že tuto bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pod vedením vedoucího školitele RNDr. Martina Štíchy, PhD. a školitele doc. RNDr. Ivana Jelínka, CSc., a že jsem uvedla veškeré použité literární zdroje. Tato práce, ani její jakákoliv část, nebyla použita pro získání jiného akademického titulu.

V Praze dne .....

Nikola Málková

## Abstrakt

Podrobná charakterizace rheniových komplexů je nutná pro jejich potenciální využití v klinické praxi a nukleární medicíně. Pro strukturní charakterizaci a kvantifikaci koordinačních sloučenin, mezi které patří i rheniové komplexy, hmotnostní spektrometrie vysoce převyšuje ostatní analytické metody především v citlivosti a selektivitě. Pro koordinační chemii je příznivá vlastnost této metody možnost stanovení analytu přímo v reakční směsi. Pro relevantní spektra je zapotřebí sloučeniny ionizovat. Ionizace těchto sloučenin však bývá velmi často obtížná, a proto je zapotřebí vyvinout speciální derivatizační postupy. V mojí práci byly připraveny a pomocí ESI-HRMS charakterizovány komplexy rhenia s 1,2-dihydroxybenzenem a 4-methyl-1,2-dihydroxybenzenem a jejich deriváty s *p*-chloranilinem a *p*-bromanilinem. Pomocí metody kolizně indukované disociace (CID) byly dále studovány jejich fragmentační mechanismy.

## Klíčová slova

Rheniové komplexy, rhenium, 1,2-dihydroxybenzen, 4-methyl-1,2-dihydroxybenzen, hmotnostní spektrometrie, derivatizace, ESI-MS, CID

## Abstract

Detailed characterization of rhenium complexes is necessary for the potential use in clinical practice and nuclear medicine. For structure characterization and quantification of coordination compounds, mass spectrometry exceeds other analytical methods in sensitivity and selectivity. The advantage of this method for coordination chemistry is the possibility of determination of the analyte directly in the reaction mixture. The compounds need to be ionized to get relevant mass spectra. The ionization of these compounds is often very difficult and it is necessary to develop a special derivatization procedures. Complexes of rhenium with 1,2-dihydroxybenzene and 4-methyl-1,2-dihydroxybenzene and its derivatives with *p*-chloroaniline and *p*-bromoaniline have been prepared and characterized by ESI-HRMS. The fragmentation mechanisms of these complexes have been studied using a mass spectrometry technique collision-induced dissociation (CID).

## Keywords

Rhenium complexes, rhenium, 1,2-dihydroxybenzen, 4-methyl-1,2-dihydroxybenzen, mass spektrometry, derivatization, ESI-MS, CID

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu školiteli mé bakalářské práce RNDr. Martinu Štíchovi, PhD. a konzultantu doc. RNDr. Ivanu Jelínkovi, CSc. za cenné rady, pomoc s vyhodnocením naměřených výsledků a se zpracováním mé bakalářské práce.

# Obsah

1. Cíl práce .....	8
2. Teoretická část.....	9
2. 1. Rhenium .....	9
2. 1. 1. Výskyt .....	9
2. 1. 2. Vlastnosti.....	9
2. 1. 3. Rheniové komplexy.....	9
2. 1. 4. Využití rheniových komplexů .....	10
2. 1. 5. Metody .....	11
2. 1. 6. Derivatizace.....	11
2. 2. Hmotnostní spektrometrie .....	12
2. 2. 1. Iontové zdroje.....	12
2. 2. 2. Hmotnostní analyzátory .....	13
2. 2. 3. Kolizně indukovaná disociace.....	13
3. Experimentální část .....	15
3. 1. Chemikálie .....	15
3. 2. Přístroje a programy .....	15
3. 3. Pracovní postup .....	15
3. 4. Podmínky měření .....	17
4. Výsledky a diskuze.....	18
5. Závěr.....	25
6. Použité literární zdroje .....	26

## Seznam zkratek

ACN	acetonitril
CID	kolizně indukovaná disociace (z angl. collision induced dissociation)
DMSA	kyselina meso-1,2-dimerkaptojantarová
DTPA	kyselina diethylentriaminopentaoctová
ESI-HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením a elektrosprejovou ionizací
HEDP	kyselina hydroxyethyldiendifosfonová
HPLC	kapalinová chromatografie s vysokým rozlišením (z angl. high-performance liquid chromatography)
IR	infračervená spektroskopie (z angl. infrared spectroscopy)
MAG <sub>3</sub>	merkptoacetylgin
MDP	kyselina methyldifosfonová
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance (z angl. nuclear magnetic resonance)
TEA	triethylamin
X-ray	rentgenová difrakce

## 1. Cíl práce

Cílem mojí bakalářské práce byla příprava komplexů rhenia s organickými aromatickými ligandy a jejich následná derivatizace. Dále bylo mým úkolem připravené reakční produkty identifikovat a charakterizovat pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením a elektrosprejovou ionizací (ESI-HRMS).



## 2. Teoretická část

### 2.1 Rhenium

#### 2.1.1 Výskyt

Rhenium bylo objeveno v roce 1925 a vyznačuje se nízkým výskytem na Zemi i ve vesmíru. Je to vzácný, stříbrolesklý, kovový prvek, který se v přírodě vyskytuje ve dvou izotopech – jako stabilní  $^{185}\text{Re}$  (37,4 %) a slabě radioaktivní  $^{187}\text{Re}$  (62,6 %) s poločasem rozpadu  $t_{1/2} = 4,12 \times 10^{10}$  roků. Další modifikací jsou uměle vytvořené radioaktivní nuklidy  $^{186}\text{Re}$  a  $^{188}\text{Re}$  [1].

#### 2. 1. 2. Vlastnosti

Rhenium patří do VII. vedlejší skupiny periodické soustavy prvků a vyskytuje se ve sloučeninách v oxidačních stavech –I až +VII, nejčastěji však ve stavech +II, +IV, +V, +VI a +VII [2]. Svými vlastnostmi se velmi podobá techneci [1]. Radioaktivní izotopy obou prvků se často využívají v medicíně, především jako součást radiofarmak pro diagnostické a terapeutické účely. V tomto odvětví je pro ně vysoké potenciální využití, a proto jejich sloučeniny musí být co nejpodrobněji popsány a prostudovány [3].

#### 2. 1. 3. Rheniové komplexy

Rhenium, jakožto přechodný kov, poskytuje koordinační sloučeniny s anorganickými i organickými ligandy [4]. Pro organické koordinační sloučeniny je běžným výchozím materiálem rhenistan ( $\text{ReO}_4^-$ ). Jeho schopnost koordinovat organické ligandy a vytvářet stabilní sloučeniny je sama o sobě ovšem nedostatečná. Atom rhenia je nejprve potřeba zredukovat na nižší oxidační stav vhodným činidlem a stabilizovat jej vybraným ligandem. Výsledný oxidační stav atomu rhenia závisí na reakčních podmínkách, vlastnostech, koncentraci a síle redukčního činidla [3,4]. Stabilita a výsledné zbarvení připraveného komplexu v reakční směsi závisí na oxidačním stavu centrálního atomu Re [5]. Předchozí experimenty potvrdily, že aromatické aminy a alkoholy, díky svým funkčním skupinám, patří mezi nejvhodnější sloučeniny pro vznik rheniových komplexů s vynikající chemickou a radiochemickou stabilitou.

#### 2. 1. 4. Využití rheniových komplexů

Rheniové komplexy mají potenciální využití především v nukleární medicíně. Nukleární medicína je lékařský obor, který provádí diagnostiku a terapii nádorových onemocnění pomocí radiofarmak. Ty jsou vpravovány ve vhodné formě do těla pacienta [6]. Radiofarmaka jsou farmaceutické látky, které ve své struktuře obsahují jeden či více radionuklidů [7]. Radionuklid má specifické vlastnosti, kterých se využívá při lékařských vyšetřeních. Těmito vlastnostmi jsou poločas přeměny radionuklidu, jeho aktivita, energie a charakter jeho záření [8]. Poločas přeměny radionuklidu je důležitý parametr a individuálně charakterizuje daný radionuklid. Představuje střední dobu života, při které dojde k přeměně poloviny atomů a hodnota radioaktivity klesne na polovinu počáteční hodnoty. Radioaktivními izotopy, které jsou předmětem zájmu v nukleární medicíně, jsou  $^{186}\text{Re}$  a  $^{188}\text{Re}$ . Ty jsou využívány k přípravě mnoha radiofarmaceutických preparátů [9,10]. Emitované  $\beta$ -záření obou radionuklidů lze využít k terapeutickým účelům. Výběr izotopu se řídí faktory jako je poločas rozpadu či technickými aspekty produkce radionuklidu [1]. K produkci radionuklidů se dnes běžně používají radionuklidové generátory.

Základem radiofarmak jsou velmi často komplexy kovů radionuklidů s organickými ligandy. Mezi takovéto látky se řadí i komplexy technecia. Technecium je radioaktivní prvek, který nemá neradioaktivní izotopy. Technecium ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) patří v nukleární medicíně mezi nejčastější radionuklid, neboť dobře vyhovuje požadavkům kladeným na radionuklid vhodný k diagnostickým účelům. Má vhodný poločas přeměny (6,02 h), snadno se váže na příslušný nosič a emitované  $\gamma$  záření má přiměřenou energii pro snadnou detekci [11]. Technecium nepatří mezi fyziologicky se vyskytující prvek v organismech, přesto je ve formě radiofarmaka pro tělo netoxické [12]. Nicméně chemie obou prvků je do jisté míry odlišná, proto nemůže být chování Re radiofarmak zcela předpovězeno z chování Tc radiofarmak. Rozdílem je větší stabilita vyšších oxidačních stavů Re a tím vyšší tendence redukováných Re radiofarmak se znovu reoxidovat na rhenistan. Dalším rozdílem je také vyšší substituční schopnost redukováných rheniových komplexů [1,13]. Mezi nejvíce rozšířené komplexy rhenia v radiofarmacii patří fosfonátové komplexy s kyselinou methylen difosfonovou (MDP) a s kyselinou hydroxyethyl diendifosfonovou (HEDP), komplexy s kyselinou meso-1,2-dimercaptojantarovou (DMSA), diethylentriaminopentaocetovou (DTPA), merkaptoacetyl glycinem ( $\text{MAG}_3$ ) a syntetickým peptidem RC-160. Mezi další využívané látky značené rheniem patří peptidy a především monoklonální protilátky a jejich konjugáty využívané v imunoterapii a imunoscintigrafii [1, 14].

Radiofarmaka musí být navržena tak, aby se akumulovala na maligním místě v cílových orgánech s minimálním poškozením okolní zdravé tkáně [13,15]. Největší využití mají rheniové komplexy v radioterapii kostních a plicních metastáz, rakoviny vaječníků a rakoviny medulární štítné žlázy [1,16].

### **2. 1. 5. Metody**

Mezi vhodné analytické metody pro identifikaci a charakterizaci koordinačních sloučenin, včetně rheniových komplexů, patří rentgenová difrakce (X-ray), nukleární magnetická rezonance (NMR) a infračervená spektroskopie (IR). Tyto metody poskytují velmi podrobné informace o analytu, ale pro analýzu vyžadují vyšší koncentraci vzorku, kterou není vždy možné poskytnout. Mezi další vhodné metody patří hmotnostní spektrometrie (MS), která je schopná analýzy sledovaných komplexů i ve stopových koncentracích a přímo v reakční směsi [3].

### **2. 1. 6. Derivatizace**

Derivatizace je provedena cílenou chemickou či fyzikální změnou analytu, která vede především ke zlepšení detekce daného analytu, zvýšení možnosti jeho separace nebo zvýšení jeho stability. Pro přesnější výsledky analýzy by měla být derivatizační reakce rychlá, kvantitativní a s minimem vedlejších produktů [17]. Proces derivatizace vzorku zahrnuje několik proměnných jako teplotu, pH reakční směsi, volbu rozpouštědla či katalyzátoru. Pro konkrétní látky je nutná optimalizace těchto reakčních podmínek. Derivatizační reakce používané v MS se často překrývají s těmi, které se používají v jiných analytických metodách. Existují některé derivatizační reakce používané speciálně pro MS jako ty, které způsobí či zvýší ionizaci vzorku nebo zavádějí ligand způsobující specifický posun hmoty, který se projevuje v hmotnostním spektru [18]. Ionizace vybraných rheniových komplexů však bývá velmi často obtížná, a proto je zapotřebí vyvinout speciální derivatizační postupy [3].

## 2. 2 Hmotnostní spektroskopie (Mass spectrometry)

Hmotnostní spektroskopie má svůj počátek již v 19. století, kdy byly poprvé prozkoumány principy pohybu nabitých částic v elektrickém a magnetickém poli. Zakladatelem této metody je Sir Joseph J. Thomson, který svojí prací zaměřenou na analýzu nabitých částic v parabolickém hmotnostním spektrografu poprvé předpověděl možnost využití této metody v chemické analýze. Všechny hmotnostní spektrometry se skládají ze tří základních částí – iontového zdroje, analyzátoru a detektoru částic [19]. Dále jsou současné hmotnostní spektrometry vybaveny vstupem pro zavedení analytu a výpočetní technikou, která převede naměřené údaje na hmotnostní spektrum. Principem metody je interakce nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Přístroj detekuje ionty vzniklé v iontovém zdroji. V analyzátoru dochází k jejich rozdělení podle poměru hmotnosti iontu a jeho náboje ( $m/z$ ). Tato metoda je vhodná pro anorganické i organické analyty a lze ji využít ke kvalitativní i kvantitativní analýze [20].

### 2. 2. 1. Iontové zdroje

Iontový zdroj je zodpovědný za převedení analytu na ionty v plynné fázi, které se po svém vzniku mohou rozpadat na fragmenty. Na základě množství dodané energie můžeme zdroje rozdělit na měkké a tvrdé [19]. Hmotnostní spektroskopie s měkkými ionizačními technikami je spolehlivá a rychlá metoda pro charakterizaci a kvantitativní analýzu různých komplexů. Pro analýzu kovových komplexů se využívají laserové desorpční techniky LDI (z angl. laser desorption ionization) a MALDI (z angl. matrix assisted laser desorption ionization) [3]. Další možnou ionizační technikou je fotoionizace za atmosférického tlaku, která je v současnosti jednou z nejměkčích technik pro analýzu a charakterizaci komplexů. Šetrnou ionizační technikou je také ESI-MS (z angl. electrospray ionization-mass spectrometry). Jedná se o atmosférickou ionizační techniku, kdy k ionizaci dochází v přítomnosti rozpouštědla. Typickým rozpouštědlem bývá acetonitril, methanol či jejich vodné roztoky [21]. Elektrosprejová ionizace poskytuje jednoduchá hmotnostní spektra s dominantním sledovaným iontem a mírnou fragmentací daného iontu. V porovnání s NMR a IR metodami, se ESI-MS vyznačuje nižšími detekčními limity a je vhodnou analytickou metodou pro strukturní charakterizaci vybraných Re komplexů. Výběr jednotlivého iontového zdroje závisí na typu analyzované látky [19, 22].

### 2. 2. 2 Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátor je umístěn za iontovým zdrojem. Umožňuje separaci iontů na základě poměru jejich hmotnosti a náboje. V současné době je nejrozšířenějším hmotnostním analyzátor kvadrupól. Kvadrupólový analyzátor je složen ze čtyř paralelních kovových tyčí, na které je přivedena kombinace střídavého a stejnosměrného napětí. Změnou velikosti střídavého a stejnosměrného napětí lze propouštět analyzátozem všechny ionty v určitém rozsahu poměru  $m/z$ . Dalším často využívaným analyzátozem je analyzátor doby letu (TOF z angl. Time of flight). TOF v lineárním módu je tvořen prázdnou trubicí. K časovému rozdělení iontů podle poměru  $m/z$  dochází na základě odlišné doby letu od iontového zdroje k detektoru. Menší ionty jsou lehčí a mají tak vyšší rychlost. Větší a hmotnější ionty se pohybují nižší rychlostí a k detektoru doráží později. Dosažené rozlišení závisí na délce dráhy iontu, kterou v průletovém analyzátozu urazí. S využitím iontového zrcadla, tkz. reflektoru, lze vyrovnat různé kinetické energie pro ionty se stejnou hodnotou poměru  $m/z$  [19]. Ionty s větší kinetickou energií proniknou hlouběji do odrazového elektrického pole iontového zrcadla před jejich odrazem a tím dojde k jejich opoždění oproti iontům s nižší kinetickou energií a k vyrovnání celkových drah iontů s různou kinetickou energií. Hloubka průniku iontu do elektrického pole iontového zrcadla je úměrná jejich kinetické energii a nezávisí na poměru  $m/z$ . Sjednocením kinetických energií dochází ke zvýšení rozlišení. Měření spekter pomocí analyzátozu doby letu je rychlé a hmotnostní rozsah není nijak teoreticky omezen. Stanovení  $m/z$  poměru částic pomocí analyzátozu doby letu poskytuje velice přesné výsledky s vysokým rozlišením [20, 21].

### 2. 2. 3. Kolizně indukovaná disociace

Použití kombinace hmotnostních analyzátozů se uplatňuje při fragmentačních experimentech především ve spojení s měkkými ionizačními technikami, kde v iontovém zdroji získáváme pouze molekulární ion [19]. Použitím několika kvadrupólových analyzátozů v řadě lze provádět tandemové analýzy (MS/MS) [23]. Při tandemovém uspořádání v čase je v iontové pasti v jednom místě provedena izolace iontu, jeho fragmentace a proměření spektra produktů. Pro tandemové uspořádání lze použít trojitý kvadrupól, který je využíván především u kvantitativní analýzy diagnostických markerů. Mezi dvěma kvadrupóly, které pracují jako hmotnostní analyzátory, je umístěna kolizní cela. Pomocí aplikace vyššího tlaku neboli přiváděním kolizního plynu a urychlení iontů elektrickým polem dochází ke srážkám iontů letících z prvního kvadrupólu s molekulami či atomy kolizního plynu. Srážky způsobí zvýšení vnitřní energie daných stabilních iontů a jejich následnou fragmentaci v plynné fázi.

Fragmentací vznikají produktové ionty, které vstupují do druhého kvadrupólu. Tento jev se nazývá kolizně indukovaná disociace CID (z angl. collision induced dissociation). Je vhodná pro objasnění struktury iontů s jinak nízkou vnitřní energií. Takové ionty jsou právě ionty vzniklé měkkými ionizačními technikami [24].

### 3. Experimentální část

#### 3. 1. Chemikálie

Tetrabutylammonium-tetrachlorooxorhenát  $[(n\text{-Bu}_4\text{-N})(\text{ReOCl}_4)]$  (98%) a triethylanim (TEA) byly zakoupeny od výrobce Sigma-Aldrich, spol. s.r.o (Gillingham, Dorset, UK). K přípravě rheniových komplexů byly použity ligandy 1,2-dihydroxybenzen a 4-methyl-1,2-dihydroxybenzen od firmy Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). Sloučeniny *p*-chloranilin a *p*-bromanilin byly zakoupeny od výrobce Sigma-Aldrich, spol. s.r.o (Gillingham, Dorset, UK) a *p*-jodanilin od výrobce Merck KGaA spol. s.r.o (Darmstadt, Germany). Acetonitril (ACN) pro HPLC od firmy Fisher Scientific (Loughborough, UK) byl použit jako rozpouštědlo.

#### 3. 2. Přístroje a programy

Pevné sloučeniny byly naváženy na analytických vahách Kern ALJ 220-4 (Kern & Sohn, Německo). Reakční směs byla míchána a zahřívána pomocí míchadla Stuart SA8 (Cole- Parmer, UK). Hmotnostní spektra byla získána přístrojem QqTOF compact (Bruker Daltonics, Německo) a vyhodnocena programem Compass Control 4.0 (Build 60.11). Molekulární vzorce, reakční schémata a fragmentační schémata byla zkonstruována programem ChemSketch (ACD labs, Kanada).

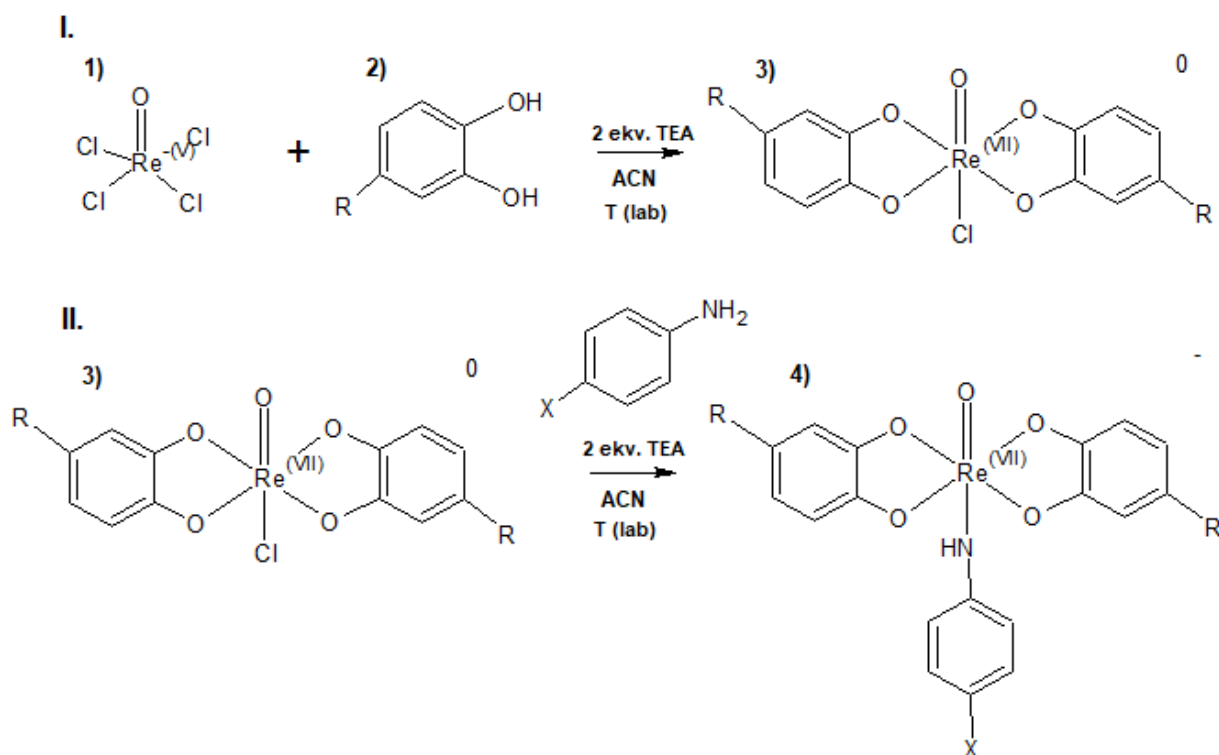
#### 3. 3. Pracovní postup

Příprava komplexu s katecholem, probíhala podle postupu publikovaném v literatuře [3] zobrazeném na obrázku 2. Příprava komplexu s 4-methyl-1,2-dihydroxybenzenem byla provedena analogickým způsobem.



Obrázek 1. Struktura výchozích ligandů 1) 1,2-dihydroxybenzen, 2) 4-methyl-1,2-dihydroxybenzen.

Za laboratorní teploty ve 3 ml acetonitrilu byl rozpuštěn jeden ekvivalent tetrabutylammonium-tetrachlorooxorhenátu  $[(n\text{-Bu}_4\text{-N})(\text{ReOCl}_4)]$  a 2 ekvivalenty ligandu tak, aby výsledná koncentrace komplexu byla  $3 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Směs byla míchána po dobu 10 min na míchadle za konstantní teploty. Dále byly přidány 2 ekvivalenty triethylaminu (10 % (v/v) roztok TEA v acetonitrilu) a vzorek by ponechán v klidu 60 hodin. Pro měření byly připravené roztoky ještě 100x naředěny acetonitrem na výslednou koncentraci  $3 \mu\text{mol dm}^{-3}$ .



Obrázek 2. Reakční schéma I. Výchozí látky 1)  $[(n\text{-Bu}_4\text{-N})(\text{ReOCl}_4)]$  a 2) 1,2-dihydroxybenzen ( $R = \text{H}, \text{CH}_3$ ) a syntéza komplexu 3)  $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]$  II. derivatizace komplexu  $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]$  halogenanilinem ( $X = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$ ) a vzniklý 4)  $[\text{Re}(\text{O})(\text{CAT})_2\text{PXA}]$



### 3. 4. Podmínky měření

Hmotnostní spektra byla naměřena přístrojem Bruker QqTOF compact za následujících podmínek:

- Rychlost dávkování vzorku: 3  $\mu$ l/min
- Tlak zmlžovače: 0,3 bar
- Rozsah skenování: m/z 50 až m/z 1000
- Napětí na kapiláře: 2800 V
- Teplota sušícího plynu: 3,0 L/min
- Průtok sušícího plynu: 3,0 L/min

Podmínky měření CID:

- Šířka izolovaného pásu: 5 Da
- Rozsah kolizní energie: 10-200 eV
- Tlak kolizního plynu ( $N_2$ ):  $2,5 \times 10^{-3}$  mbar

## 4. Výsledky/ diskuze

Byly připraveny a pomocí hmotnostní spektrometrie charakterizovány deriváty rheniových komplexů s *p*-bromanilinem a *p*-chloranilinem. Za stejných reakčních podmínek byly připraveny i deriváty s *p*-jodanilinem, ale protože výtěžky reakcí byly znatelně nižší, nebyly tyto látky dále studovány.

Seznam připravených komplexů s naměřenými daty jsou uvedeny v tabulce 1. Ve všech případech byla konstatována výborná shoda experimentálně naměřených hodnot *m/z* s teoretickými hodnotami, přičemž chyba měření nepřekročila 2 ppm.

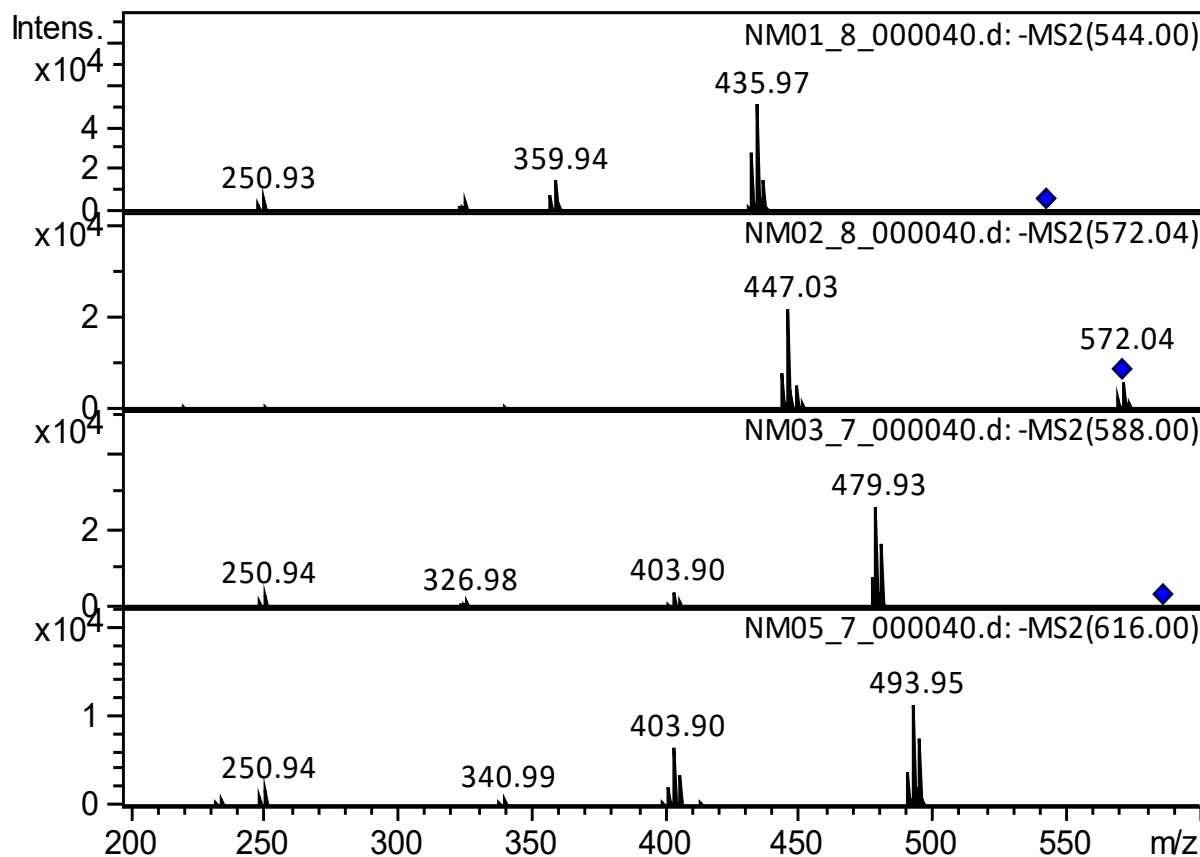
Tabulka 1 – HRMS charakterizace připravených derivátů

kód	Název	Označení	Sumární vzorec	Měřená <i>m/z</i>	Teoretická <i>m/z</i>	Chyba [ppm]
NM01_8	N-(bis(1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium)-parachloroaniline	[Re(O)(CAT) <sub>2</sub> PCA]	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>5</sub> Re	543,9967	543,9969	-2,0
NM02_8	N-(bis(4-methyl-1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium)-parachloroaniline	[Re(O)(DHT) <sub>2</sub> PCA]	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>5</sub> Re	572,0280	572,0277	-1,0
NM03_7	N-(bis(1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium)-parabromoaniline	[Re(O)(CAT) <sub>2</sub> PBA]	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> BrNO <sub>5</sub> Re	587,9461	587,9436	1,4
NM05_7	N-(bis(4-methyl-1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium)-parabromoaniline	[Re(O)(DHT) <sub>2</sub> PBA]	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> BrNO <sub>5</sub> Re	615,9774	615,9753	0,8

Kolizní experimenty, při kterých byla postupně po 1 eV zvyšována laboratorní kolizní energie **CE** v intervalu 10–200 eV byly provedeny se všemi připravenými komplexy. U všech iontů obsahujících rhenium byl registrován charakteristický izotopový profil odpovídající přirozenému zastoupení izotopů rhenia <sup>185</sup>Re/<sup>187</sup>Re v poměru 37 %/63 %. Tento charakteristický profil izotopů byl využit i pro identifikaci fragmentových iontů, a proto byly prekurzní ionty izolovány v intervalu širokém 5 Da.

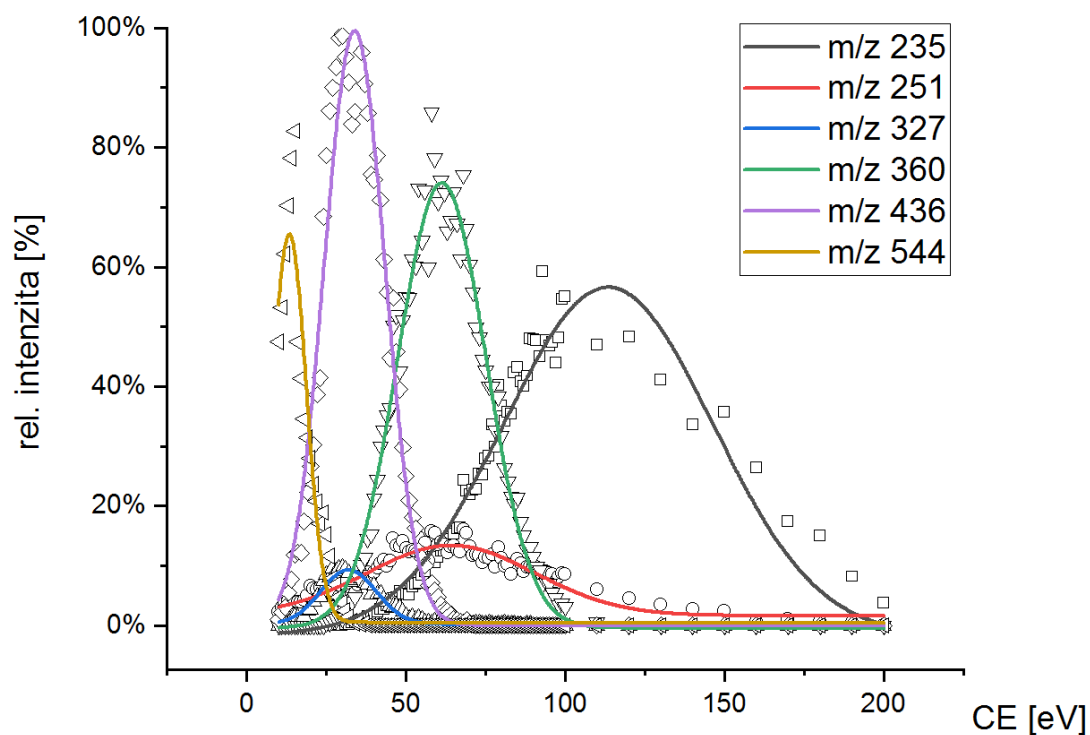
MS/MS spektra všech komplexů zaznamenána při hodnotě CE 40 eV jsou na obrázku 3. Z obrázku je patrné, že komplex NM02\_8 vykazuje značně odlišné chování, což bude podrobněji diskutováno při interpretaci fragmentačního mechanismu. Na druhou stranu

můžeme u všech spekter pozorovat určitou analogii a dokonce shodnou přítomnost iontů  $\text{ReO}_4^-$   $m/z$  251 a  $\text{ReO}_3^-$   $m/z$  235 vznikajících při nejvyšších kolizních energiích.

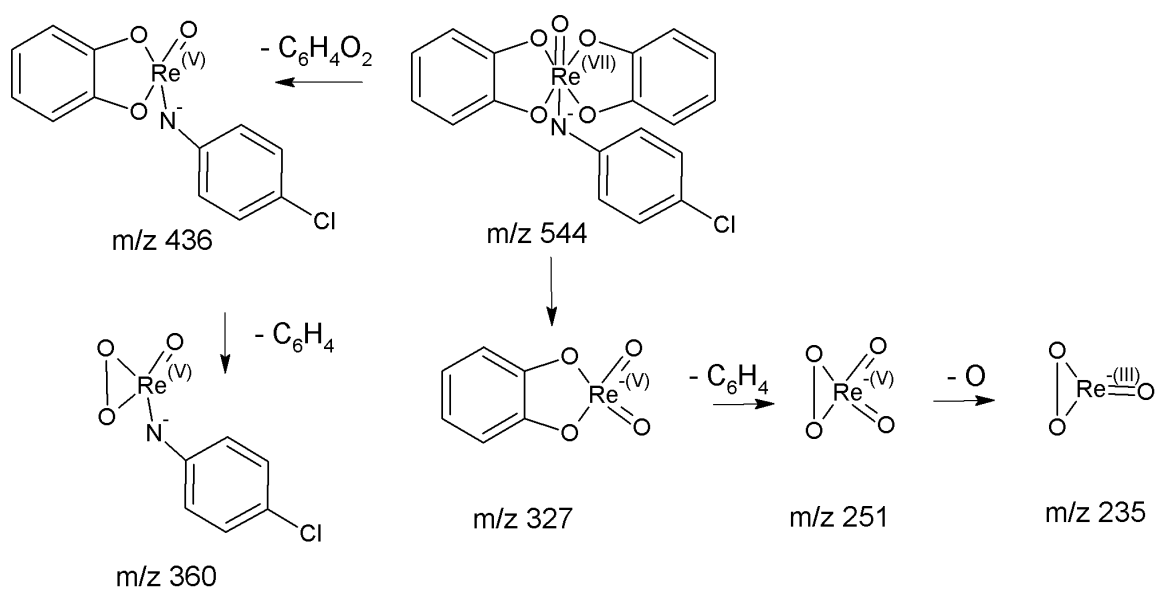


Obrázek 3. Fragmentační spektra rheniových komplexů zaznamenané při laboratorní kolizní energii CE 40 eV

Prvním připraveným derivátem byla látka označená na obrázku 3. kódem NM01\_8. Hlavní fragment s nejvyšší intenzitou  $m/z$  436 v tomto případě vznikl z molekulového iontu  $m/z$  544 odstoupením celého katecholového ligandu. Společně s těmito ionty byl ve spektru pozorován ještě třetí iont  $m/z$  360 potvrzující svým izotopovým profilem přítomnost jednoho atomu chloru. Tento iont vzniká odstoupením aromatické části druhého ligandu a predikuje skutečnost, že vazba derivatizačního činidla je patrně pevnější než vazby obou katecholů. Naproti tomu izotopové profily zbylých iontů vzniklých ztrátou *p*-chloranilinové skupiny již odpovídají přítomnosti pouze centrálního atomu rhenia. Z výsledku CID experimentu dále vyplývá, že prekurzorem iontu  $\text{ReO}_3^-$   $m/z$  235, který vzniká až při vysokých kolizních energiích, je pravděpodobně iont  $\text{ReO}_4^-$   $m/z$  251. Schematicky tuto fragmentaci vystihuje obrázek 5. a průběh CID experimentu je na obrázku 4.

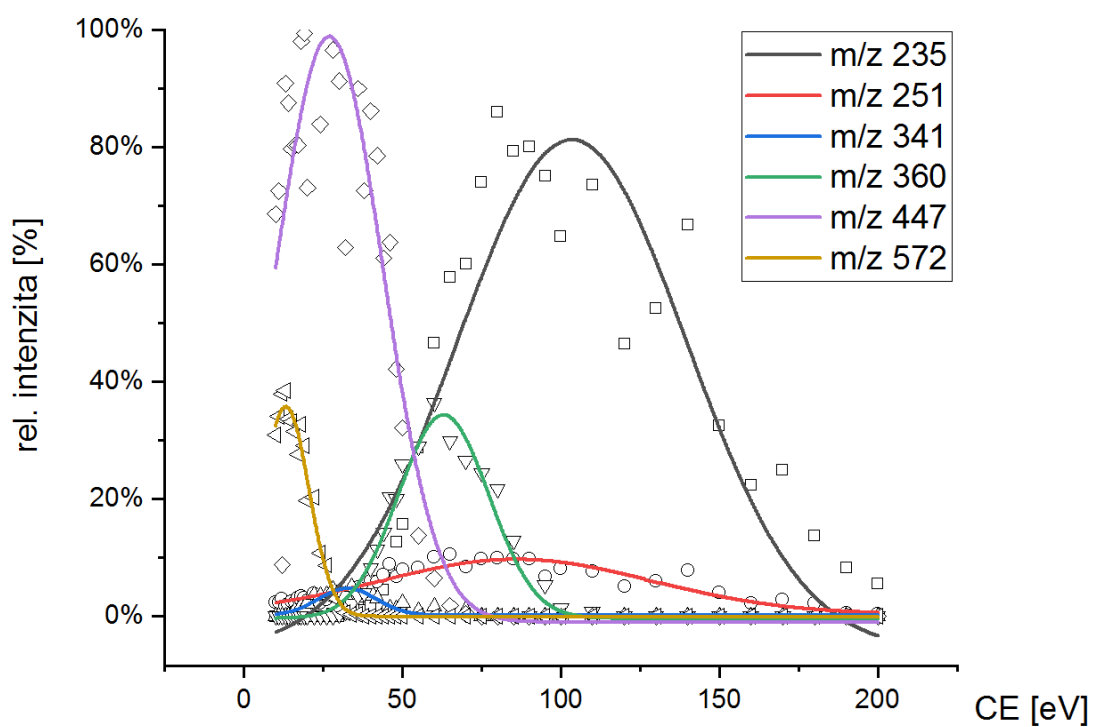


Obrázek 4. Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací  $[\text{Re}(\text{O})(\text{CAT})_2\text{PCA}]$  na kolizní CE

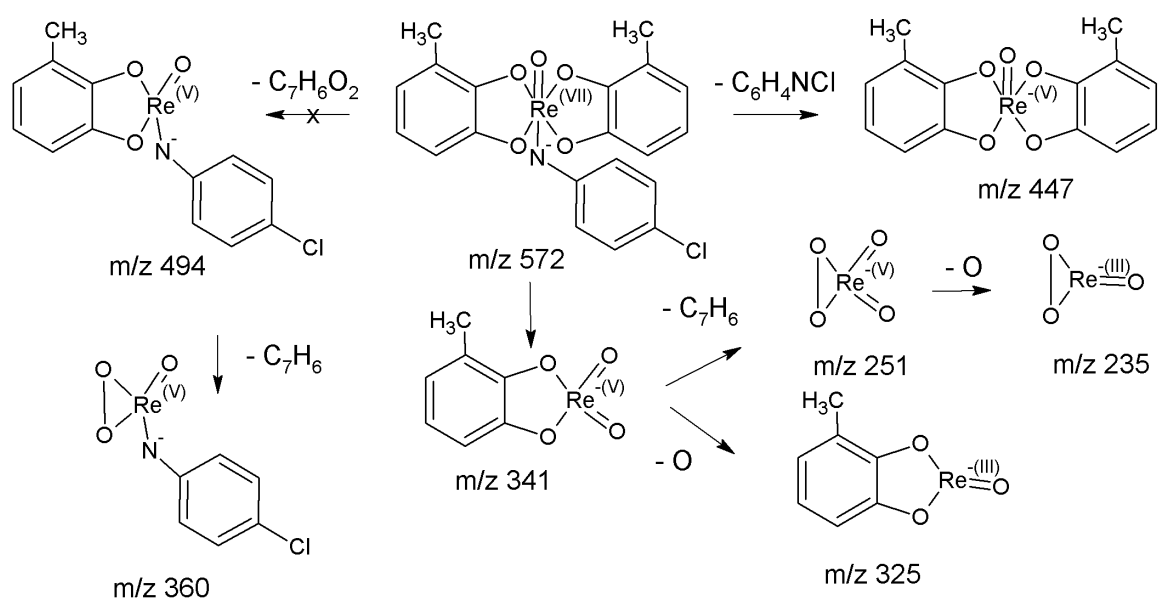


Obrázek 5. Fragmentační schéma komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{CAT})_2\text{PCA}]$

Poněkud překvapivý mechanismus fragmentace byl zaznamenán u komplexu s methylcatecholem označovaným  $[\text{ReO}(\text{DHT})_2\text{PCA}]$ . Na obrázku 3. je toto spektrum pod kódem NM02\_8. Na první pohled je zde patrná zjevná odlišnost ve srovnání s ostatními studovanými komplexy. V MS/MS spektru naprosto chybí iont  $m/z$  450, který by vznikl ztrátou celého ligandu, jak bylo pozorováno ve spektru catecholového komplexu. Namísto toho, pravděpodobně díky oslabení vazby, dochází ke ztrátě anilínové skupiny, což vede k tvorbě velmi dobře stabilizovaného iontu  $[\text{ReO}(\text{DHT})_2]^-$   $m/z$  447, jehož intenzita dokonce i při nízkých kolizních energiích převyšuje molekulární iont  $m/z$  572. Tento hlavní iont se pak fragmentuje obvyklým způsobem a to postupnou ztrátou obou ligandů za vzniku iontu  $m/z$  341 a  $m/z$  325. Ve shodě s předchozím dosud nepublikovaným výzkumem bylo opět pozorováno, že při fragmentaci komplexů, kde rhenium vystupuje v oxidačním stavu  $5^+$  není iont  $\text{ReO}_4^-$   $m/z$  251 prekurzorem pro vznik iontu  $\text{ReO}_3^-$   $m/z$  235, což potvrzují výsledky CID experimentů. Kromě tohoto majoritního fragmentačního procesu byl poněkud překvapivě zaznamenán ještě iont  $m/z$  360 vznikající ztrátou obou ligandů a současným zachováním vazby na chloranilin. Proměřením přesné hmoty i porovnáním izotopických profilů potvrzuje totožnost tohoto iontu s iontem přítomným ve spektru catecholového komplexu NM01\_8. Popsaný fragmentační mechanismus shrnuje schéma na obrázku 7. a průběh CID experimentu je na obrázku 6.

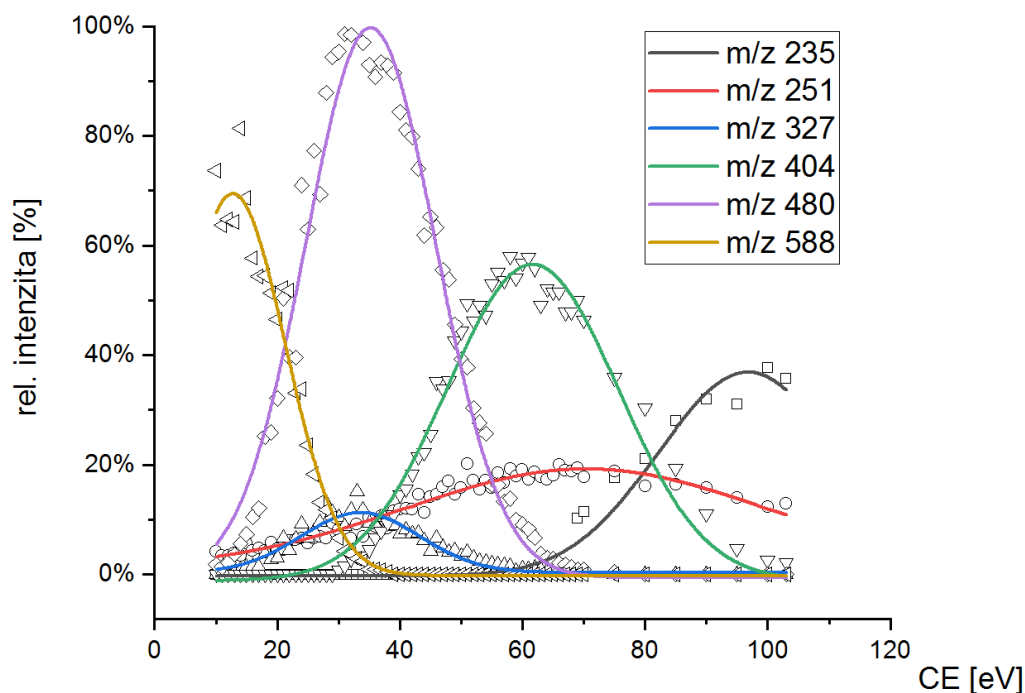


Obrázek 6. Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací  $[Re(O)(DHT)_2PCA]$  na kolizní CE

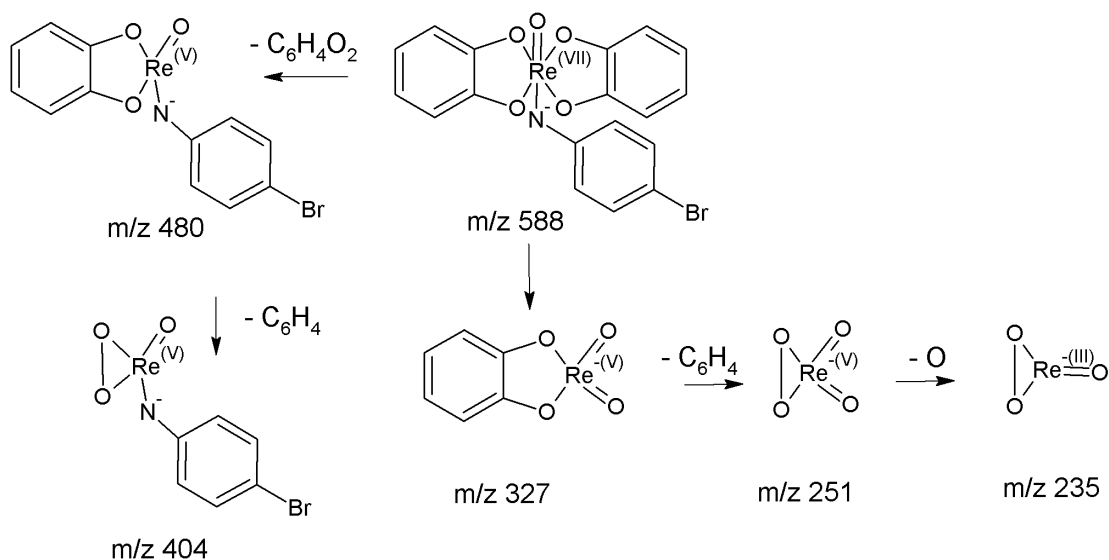


Obrázek 7. Fragmentační schéma komplexu  $[Re(O)(DHT)_2PCA]$

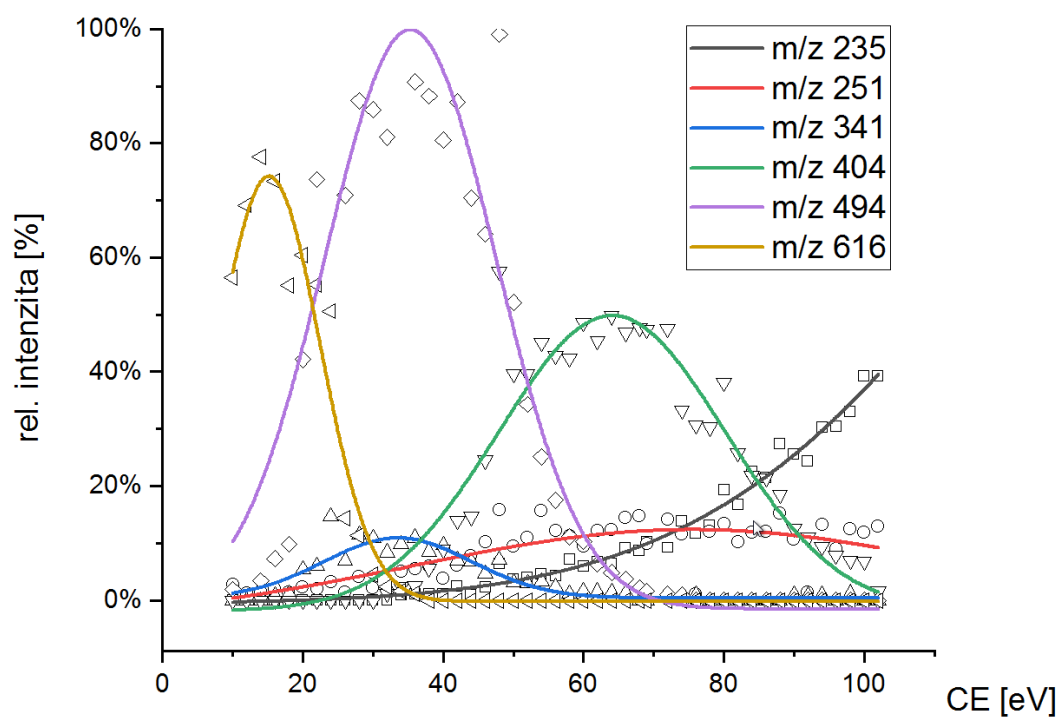
Anomálie v chování iontu  $[\text{ReO}(\text{DHT})_2\text{PCA}]^-$  již nebyla u derivátů s PBA pozorována. V obou zbývajících případech bylo snadné díky charakteristickému izotopickému zastoupení identifikovat ionty, ve kterých byl přítomen brom. Bylo konstatováno, že fragmentační mechanismus je u těchto derivátů shodný a zcela analogický k derivátu NM01\_8. Fragmentační schémata a CID diagramy jsou zachyceny na obrázcích 8-11.



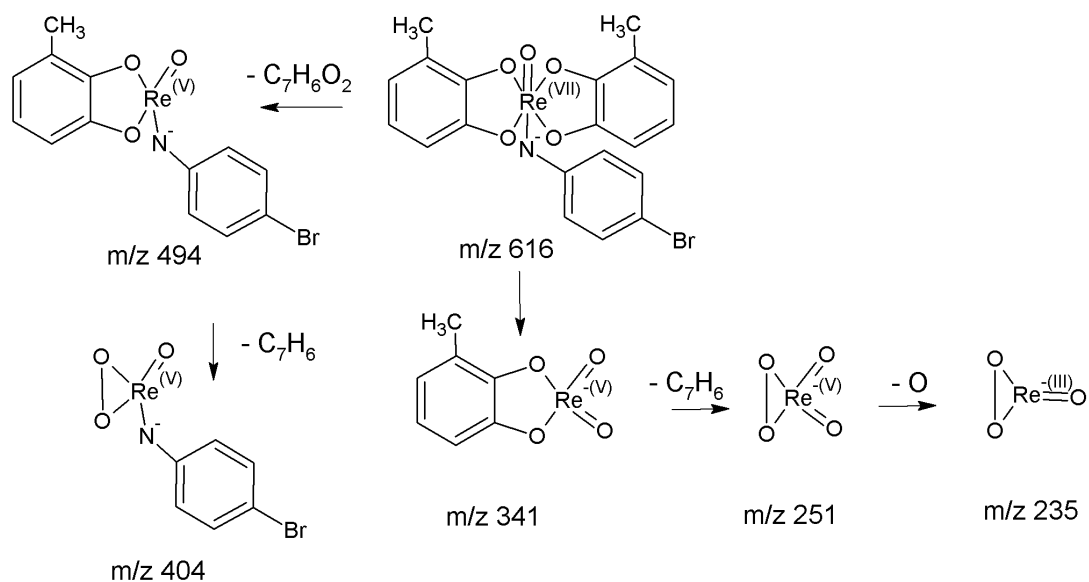
Obrázek 8. Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací  $[\text{Re}(\text{O})(\text{CAT})_2\text{PBA}]$  na kolizní CE



Obrázek 9. Fragmentační schéma komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{CAT})_2\text{PBA}]$



Obrázek 10. Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací  $[\text{Re}(\text{O})(\text{DHT})_2\text{PBA}]$  kolizní CE



Obrázek 11. Fragmentační schéma komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{DHT})_2\text{PBA}]$



## 5. Závěr

Podařilo se úspěšně syntetizovat komplexy rhenia s 1,2-dihydroxybenzenem a 4-methyl-1,2-dihydroxykatecholem. Ty byly následně derivatizovány *p*-bromanilinem a *p*-chloranilinem. Komplexy byly identifikovány a charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením a elektrosprejovou ionizací. Komplexy N-(bis(1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium)-parachloroaniline, N-(bis(4-methyl-1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium)-parachloroaniline a N-(bis(4-methyl-1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium)-parabromoaniline jsou nově syntetizované látky, o kterých doposud nejsou známe žádné publikace. U všech studovaných komplexů byla zjištěna vysoká shoda izotopových profilů. Připravené komplexy byly podrobeny metodě CID a výsledky byly použity k navržení fragmentačních mechanismů.

## 7. Použité literární zdroje

- [1] Kohlíčková M., Jedináková-Křížová V., Melichar F.: *Komplexní sloučeniny rhenia v nukleární medicíně*. Chemické listy (2000).
- [2] Cotton F. A., Wilkinson G., Gaus P. L.: *Basic inorganic chemistry, 3rd ed.* New York, Wiley (1995). ISBN 0-471-50532-3
- [3] Štícha M., Jelínek I., Poláková J., Kaliba D.: *Characterization of Rhenuim(V) Complexes with Phenols using Mass Spectrometry with Selected Soft Ionization Techniques*. Analytical Letters (2015).
- [4] Dabrowiak J. C. *Metals in medicine, 2nd edition.* (2009). ISBN 978-1-119-19130-8
- [5] Deutsch E., Libson K., Jean-Luc Vanderheyden J., Ketring A. R., Maxon H. R. *The chemistry of rhenium and technetium as related to the use of isotopes of these elements in therapeutic and diagnostic nuclear medicine*. International Journal of Radiation Applications and Instrumentation (1986).
- [6] Mysliveček M. *Nukleární medicína*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. (2007). ISBN 978-80-244-1723-3.
- [7] Květina J. *Radiofarmaka: učebnice pro farmaceutické fakulty*. Praha: Avicenum (1987).
- [8] Kupka K., Kubinyi J., Šamál M. *Nukleární medicína [učební text]*. Praha: (2007). ISBN 978-80-903584-9-2.
- [9] Sengupta S., Panda B. K. *Development of Rhenium Radiofarmaceuticals from Coordination Chemistry*. Asian J. Research Chem. 369-376 (2017).
- [10] Hock S. J., Schaper L., Hermann W. A., Kuhn F. E. *Group 7 transition metal complexes with N-heterocyclic carbens*. Chemical Society Reviews (2013).
- [11] Blažek O. a kol. *Radiologie a nukleární medicína*. 1. vydání. Praha: Avicenum (1989). 424 s. ISBN 08-060-89

- [12] Atominfo. [cit. 20. 3. 2018]. URL:<http://atominfo.cz/2012/12/technecium-99m-vyroba-a-uplatneni-nejuzivanejsiho-radioizotopu-v-lekarske-diagnostice/>
- [13] Jurgens S., Herrmann A., Fritz E. Kuhn. *Rhenium and technetium based radiopharmaceuticals: Development and recent advances*. Journal of Organometallic Chemistry 751/83-89 (2014).
- [14] Santos I, Paulo A. Correia D. G. Joao. *Rhenium and Technetium Complexes Anchored by Phosphines and Scorpionates for Radiopharmaceutical Applications* Top Curr Chem (2005).
- [15] Hashimoto K., Yoshihara K. *Rhenium complexes labeled with  $^{186,188}\text{Re}$  for nuclear medicine*. Technetium and Rhenium Their Chemistry and Its Applications. Topics in Current Chemistry 176. Springer, Berlin, Heidelberg (1996). ISBN: 978-3-540-49273-3
- [16] *Bench to bedside development of GMP grade Rhenium-188-HEDP, a radiopharmaceutical for targeted treatment of painful bone metastases* International Journal of Pharmaceutics 465/ 317–324 (2014).
- [17] Štulík K. a kol. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum (2004) 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [18] Zaikin V. G., Halket J. M. *Derivatization in Mass Spectrometry – 8. Soft Ionization Mass Spectrometry of Small Molecules* European Journal of Mass Spectrometry Vol 12, Issue 2 (2006).
- [19] Fridecký D., Lemr K. *Úvod do hmotnostní spektrometrie*. Klin. Biochem. Metab., 20 (41). 152–157 (2012).
- [20] Hoffmann, E. De, & Stroobant, V.: *Mass Spectrometry - Principles and Applications. Mass spectrometry reviews* (3rd ed.) (2007).
- [21] Kebarle P. *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. Journal of mass spectrometry (2000).

- [22] Tisato F., Bolzati C., Porchia M., Refosco F.: *Contribution of Electrospray Mass Spectrometry for the characterization, design, and development of Nitrido Technetium and Rhenium Heterocomplexes as potential radiopharmaceuticals*. Mass Spectrometry Reviews (2004).
- [23] Finnigan R. E. *Quadrupole mass Spectrometers*. Analytical chemistry 66 969A-975A (1994).
- [24] McLafferty F.W., Bente P.F. Kornfeld R., Tsai S.C.; Howe, Ian: *Collisional Activation Spectra of Organic Ions*. Journal of the American Chemical Society 2120-2129 (1973).